

## 使用MaxPeak™ Premier色谱柱和系统性筛选方法快速开发用于分析结构相似三嗪类除草剂的RPLC方法

---

Kenneth D. Berthelette, Jonathan E. Turner, Jamie Kalwood, Kim Haynes

Waters Corporation

---

### 摘要

三嗪类除草剂可去除入侵植物物种，常用于作物管理。此类除草剂会破坏光合作用循环，导致植物死亡，如果使用浓度和持续时间达到一定程度，还会污染土壤和地下水。因此，监测这些除草剂对于尽量减少和监测污染非常重要。我们需要采取一种性能充分的适当方法，确保对样品进行稳定的分析，从而用于监测这些分析物。

本文所述研究使用系统性筛选策略开发出一种分析方法，可用于分析由七种具有相似结构的三嗪类除草剂组成的混合物。通过该策略，只用了11个小时，分为两天时间进行方法开发和优化就确定了最终方法条件：最终方法条件采用XBridge™ Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱和碱性改性乙腈流动相。无论是UV还是MS检测，所有七种分析物均实现了良好的分离和检测，两种方法均适用于未来的工作（例如样品分析或定量分析）。

### 优势

- 使用XBridge Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱对七种分析物进行基线分离
  - 在11小时内开发用于分析结构相似化合物混合物的方法
  - 系统性筛选策略通过简化流程减少决策制定
-

---

## 简介

多年来，除草剂和农药一直广为使用。直到最近，环境法规才发生变化，开始监管甚至禁止使用某些农药和除草剂。这些化合物虽然有诸多优势，但通常会污染土壤和地下水，对环境造成严重影响。这些化合物一旦进入地下水和土壤，就会进入食物链，导致野生动物死亡。考虑到环境影响，对于农药和除草剂使用情况的监测受到严格控制。因此，有必要通过适当的分析方法来分离和检测这些化合物。使用反相液相色谱(RPLC)进行方法开发是一条“单行线”，尤其是对于某些类别的化合物，例如三嗪类除草剂。

三嗪类除草剂通过破坏光合作用过程导致细胞死亡，起到控制入侵植物的作用。最常见的三嗪类除草剂是阿特拉津，研究表明它不仅能有效杀灭杂草，还会浸出到土壤和地下水中，影响水生生态系统<sup>1</sup>。此外，已有多项计划将其他三嗪类除草剂（如扑灭津和西玛津）列为监测对象，旨在确定它们对水生生物的影响<sup>2</sup>。如引用文献所示，RPLC是监测这些化合物的常用方法，使用此方法的前提是可以实现充分分离。质谱(MS)也是一种常用方法，并可以从目标分析物的完全分离中获益，因为完全分离可改善MS信号。

借助于有据可查的系统性筛选策略，我们可以轻松地创建用于保留和检测三嗪类除草剂的方法<sup>3-6</sup>。这种系统性筛选使用分层分析方法，分析人员首先评估高pH和低pH下的保留性，然后锁定具体的pH。接下来进行色谱柱和流动相筛选，并选择理想的固定相与流动相组合。最后，根据需要优化方法。这种方法可以快速开发方法，大幅减少决策制定。

将简便易用的系统性筛选策略与采用MaxPeak高性能表面(HPS)技术的MaxPeak Premier色谱柱结合使用，可以消除分离中的疑虑。MaxPeak Premier色谱柱经过专门设计，旨在减少系统（包括色谱柱）金属表面与目标分析物之间的次级相互作用。该技术专为减轻金属表面与目标化合物之间的离子相互作用而设计，不仅如此，已有研究表明该技术还能够改善多种分析物类别的整体分离质量<sup>7-10</sup>。本文介绍了一种使用MaxPeak Premier色谱柱对七种三嗪类除草剂的混合物进行系统性筛选策略的应用，该策略可确保获得尽可能准确的数据。

---

## 实验

### 样品描述

三嗪类除草剂的单一混合物购自Sigma Aldrich（部件号：CRM48392），每种除草剂的起始浓度均为100 μg/mL。标准品用水按1:10的比例稀释后进样。最终样品组成为90:10的水:甲醇，各种除草剂的最终浓度为10 μg/mL。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC™ H-Class Plus系统, 配备四元溶剂管理器(QSM)和可选的溶剂选择阀、流通针式样品管理器(SM-FTN)、色谱柱管理器、辅助色谱柱管理器、PDA检测器和QDa质谱检测器
检测:	UV @ 220 nm (除非另有说明) 使用MS全扫描和SIR进行峰追踪
色谱柱:	所有色谱柱的尺寸均为2.1 × 50 mm (粒径2.5 μm)  XBridge Premier BEH C <sub>18</sub> (P/N: 186009827)  XSelect™ Premier CSH苯己基柱(P/N: 186009879)  XBridge Premier BEH Shield RP18 (P/N: 186009914)  Atlantis Premier BEH C <sub>18</sub> AX (P/N: 186009390)
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1.0 μL
流速:	0.7 mL/min
流动相A:	Milli-Q水
流动相B:	乙腈
流动相C:	甲醇

梯度条件:

流动相D在整个梯度中始终保持在5%以确保添加剂浓度一致。线性梯度, B/C在4.90 min内从5%增加至95%95% B/C保持0.82分钟。返回到5% B/C的起始条件并保持1.6分钟。总运行时间为7.37分钟。优化梯度的详细信息见图片说明。

## 数据管理

色谱软件:

Empower™ 3 Feature Release 4

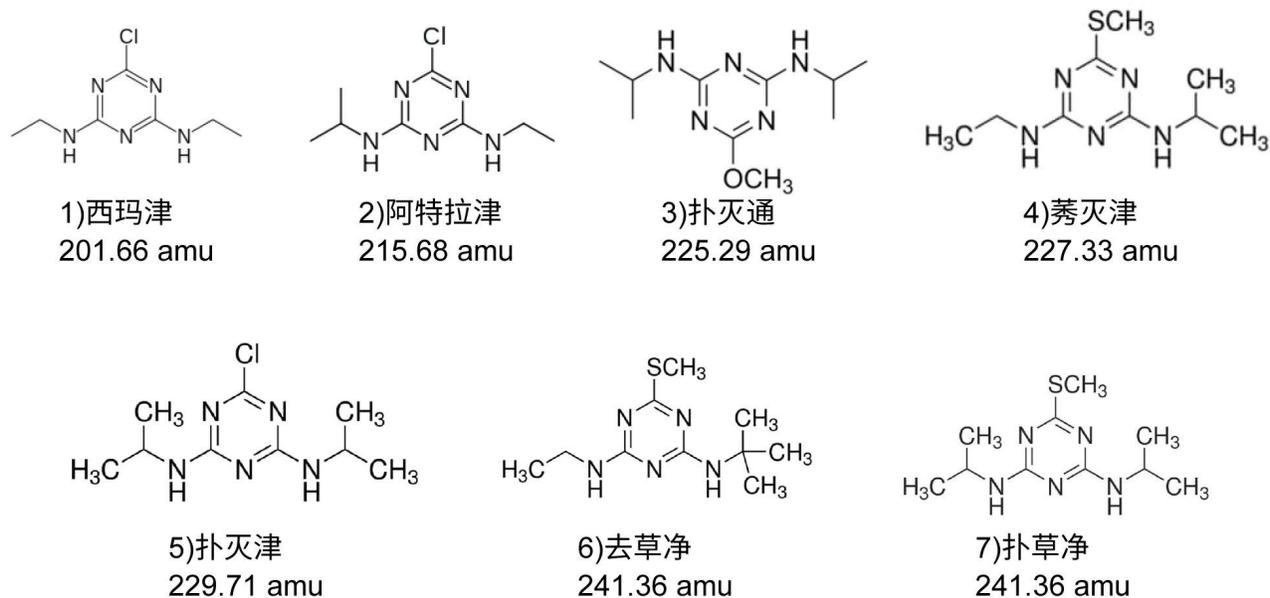


图1.样品混合物中的分析物的化学结构。注意同量异位化合物去草净(6)和扑草净(7)。

## 结果与讨论

如之前的研究所述, 使用系统性筛选策略进行方法开发时, 首先要评估流动相pH对分离的影响<sup>6-10</sup>。此步骤可使

用兼容高pH的固定相，例如XBridge Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱。该色谱柱采用在高pH条件下不易溶解的杂化硅胶基质颗粒。使用乙腈5%~95%的标准筛选梯度，分别添加低pH和高pH添加剂甲酸和氢氧化铵。运行数据后，将检查结果以确定哪种添加剂的保留性最强。图2展示了系统性筛选策略第一步得到的两张色谱图。

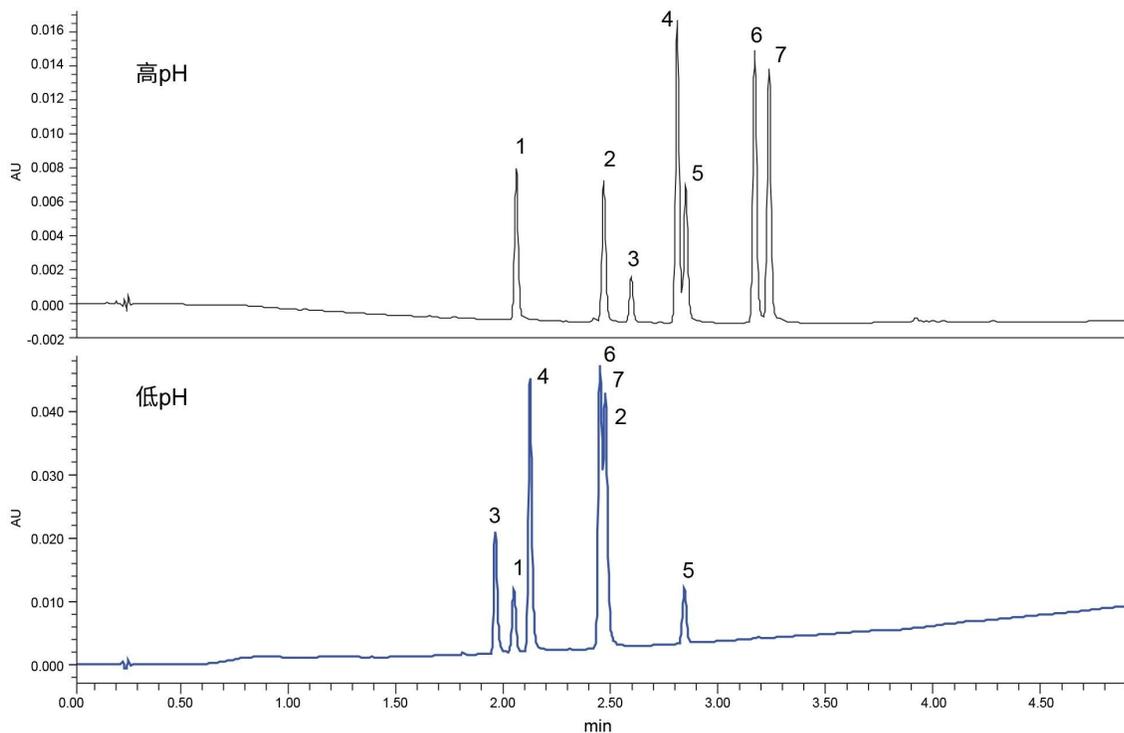


图2.使用XBridge Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱在254 nm处进行UV检测的快速pH探索结果。组分ID列于图1。

观察到两种添加剂均具有良好的保留性，第一种化合物在两分钟左右洗脱，这几乎是梯度的一半。但在高pH条件下，总体保留性更好，洗脱窗口为2~3.5 min，而低pH条件下的洗脱窗口约为2~3 min。高pH添加剂的保留性更高，更有助于分析人员在需要时进行方法优化。此外，这一步可以让分析人员更好地了解目标分析物，以及它们在高pH和低pH条件下的行为。除峰5（扑灭津）外，所有化合物在低pH条件下的保留性较差，而扑灭津在两次实验之间的保留性相似。

由于这些探针在高pH条件下的总体保留性更好，因此我们锁定了添加剂以备将来实验使用。这将对下一步，即固定相和有机溶剂的筛选产生深远影响。鉴于选择了高pH，所用的固定相必须在高pH下稳定，也就是说我们要选择杂化基质颗粒。这在一定程度上限制了键合填料的选择。幸运的是，即使在高pH条件下，也可以尽可能提高色谱

柱选择性。本研究第二步将使用XBridge Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱、XSelect Premier CSH苯己基色谱柱、XBridge Premier BEH Shield RP18色谱柱进行测试，最后使用Atlantis Premier BEH C<sub>18</sub>-AX色谱柱。这些色谱柱均使用具有不同键合相的杂化基质颗粒，可提供一定的选择性优势。使用甲醇时，苯己基固定相可提供潜在的次级π-π相互作用，是分析带芳香环化合物的理想选择。Shield RP18固定相使用类似的线性链配体，但采用嵌入式极性基团，在本例中为氨基甲酸酯基团，这会影响化合物的保留和分离，尤其是在乙腈占比较低的情况下。最后，C<sub>18</sub>-AX固定相是具有离子交换(IEX)官能团的中等覆盖率C<sub>18</sub>固定相。虽然IEX基团的设计目的是保留极性分析物，但它仍然会影响非酸性探针的分离。图3显示了使用甲醇作为强溶剂在四种固定相上得到的三嗪类除草剂分离结果。

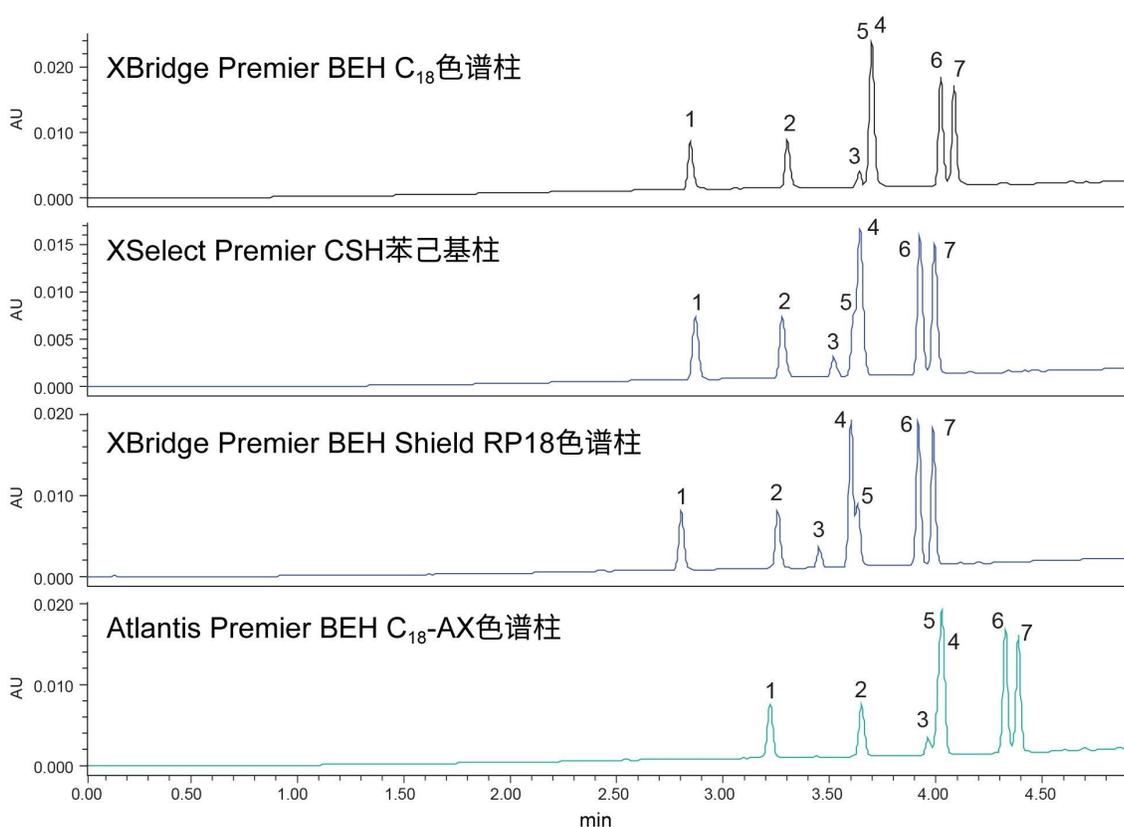


图3.在254 nm紫外波长下使用甲醇对色谱柱和溶剂进行筛选得到的色谱图。组分ID列于图1中。

所选色谱柱均无法完全分离存在的七种组分。组分4和组分5分别是莠灭津和扑灭津，这两种组分在这些条件下很难分离，在所有四种固定相上都发生了共洗脱。此外，在C<sub>18</sub>-AX固定相上，组分3的一部分与该对化合物对共洗脱。观察这些分离时，需要注意莠灭津(4)和扑灭津(5)的洗脱顺序。扑灭津在其中三个固定相上先洗脱，但在Shield

RP18固定相上后洗脱。在该色谱柱上，扑灭津峰在莠灭津之后洗脱。这很可能是由于键合相中存在氨基甲酸酯基团。但最终，这些实验均未提供可用于方法优化的良好分离。图4显示了使用相同的色谱柱和乙腈流动相得到的相同化合物混合物的分离结果。

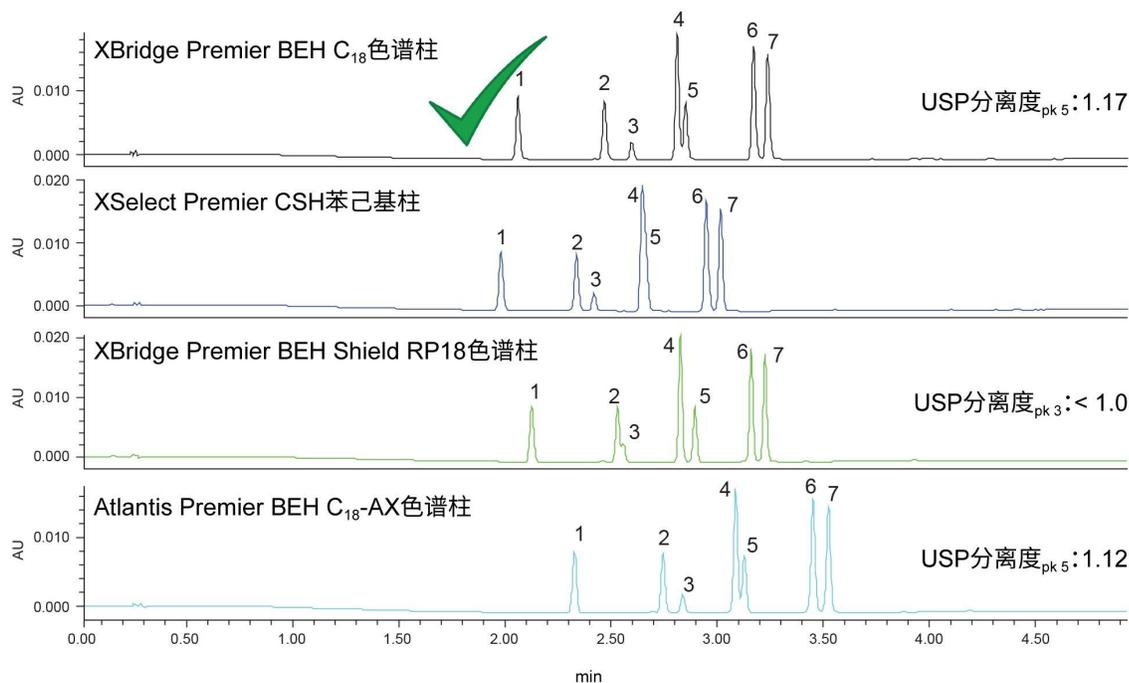


图4.使用乙腈在254 nm紫外波长下筛选色谱柱和溶剂得到的色谱图组分ID列于图1中。

在少部分固定相上，组分4和5仍与乙腈共洗脱。但是，使用C<sub>18</sub>和C<sub>18</sub>-AX固定相均实现了化合物的部分分离。Shield RP18固定相也可以完全分离这对组分。然而，Shield RP18无法分离组分2和组分3，即阿特拉津和扑灭通。不过，这两种组分在其他固定相上得到了很好的分离。

通过检查这些色谱图确定一组合适的条件时，可以排除苯己基固定相，因为组分4和5之间的分离度较差。其余三组条件各有利弊。针对其余三种条件，如果检查每对关键分析物对的共洗脱物对的USP分离度，则接下来可以排除Shield RP18色谱柱。由于峰3的USP分离度<1.0，因此在该色谱柱上优化方法将非常困难。C<sub>18</sub>和C<sub>18</sub>-AX固定相的分离结果非常相似，峰5的USP分离度分别为1.17和1.12。客观来说，XBridge Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱的分离效果相比其他色谱柱更好，更利于优化。但是，Atlantis Premier BEH C<sub>18</sub>-AX也可能适用于优化。本研究使用C<sub>18</sub>固定相进行方法优化。

方法优化包括但不限于调整梯度斜率、流动相的起始和终止有机溶剂百分比、柱温以及色谱柱尺寸或粒径。本研

究的第一步是在方法开始时提高有机溶剂比例，同时减缓梯度。分两步完成。首先，根据第一个峰的洗脱时间计算出有机溶剂的大致百分比。在本例中，给定的筛选梯度下，西玛津的第一个峰在大约40%的有机溶剂条件下洗脱。在优化步骤中，使用35%的起始百分比来确保第一个峰得到充分保留。此后，从初始有机溶剂/色谱柱体积( $V_C$ )的3.0%开始，减缓梯度。本研究测试了两种不同的梯度斜率，并监测了峰5的USP分离度。图5显示了通过该优化步骤获得的分离结果。

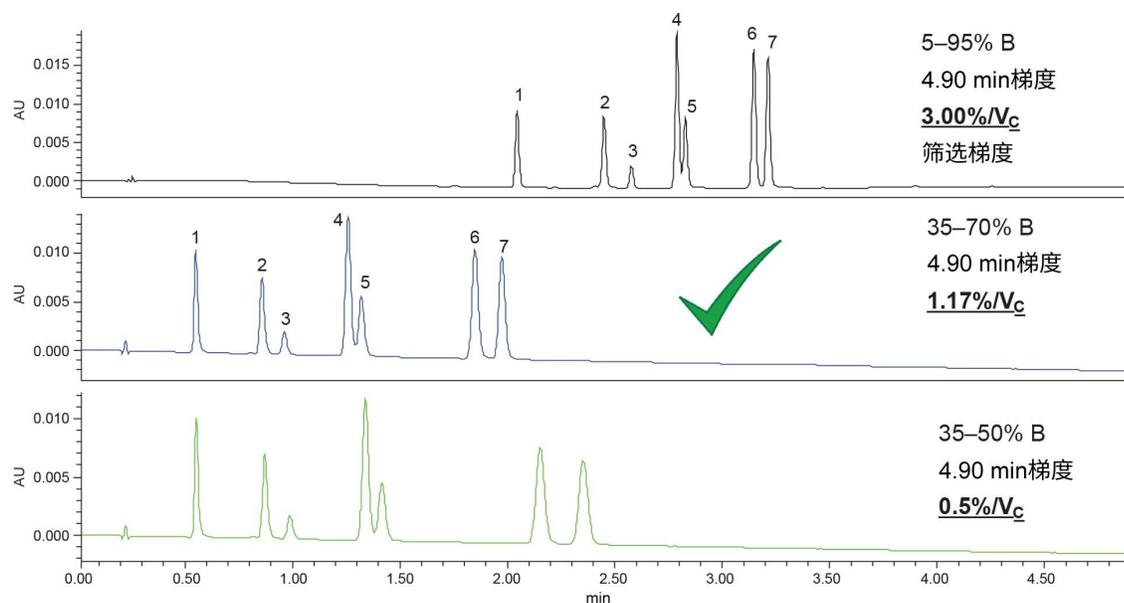


图5.254 nm处的梯度斜率调整优化结果。组分ID列于图1。

图5中间的色谱图展示了第一次优化尝试，将梯度斜率从3.0%/V<sub>C</sub>降低至1.17%/V<sub>C</sub>。峰5的USP分离度从1.17提高至1.31，改善不明显。另一项通过减缓梯度斜率来改善分离的尝试是采用梯度斜率为0.5%/V<sub>C</sub>的方法。但是，该分离方法的USP分离度与1.17%/V<sub>C</sub>的结果相当，分离结果没有明显改善。选择斜率为1.17%/V<sub>C</sub>的条件进行进一步优化，因为与原始条件相比，该条件提高了分离度，并且与0.5%/V<sub>C</sub>结果相比，峰更窄。优化的下一步是调整柱温。在本例中，将温度调整为40 °C，使用1.17%/V<sub>C</sub>梯度方法，并与在30 °C下获得的结果进行了比较，如图6所示。

## 调整柱温(254 nm)

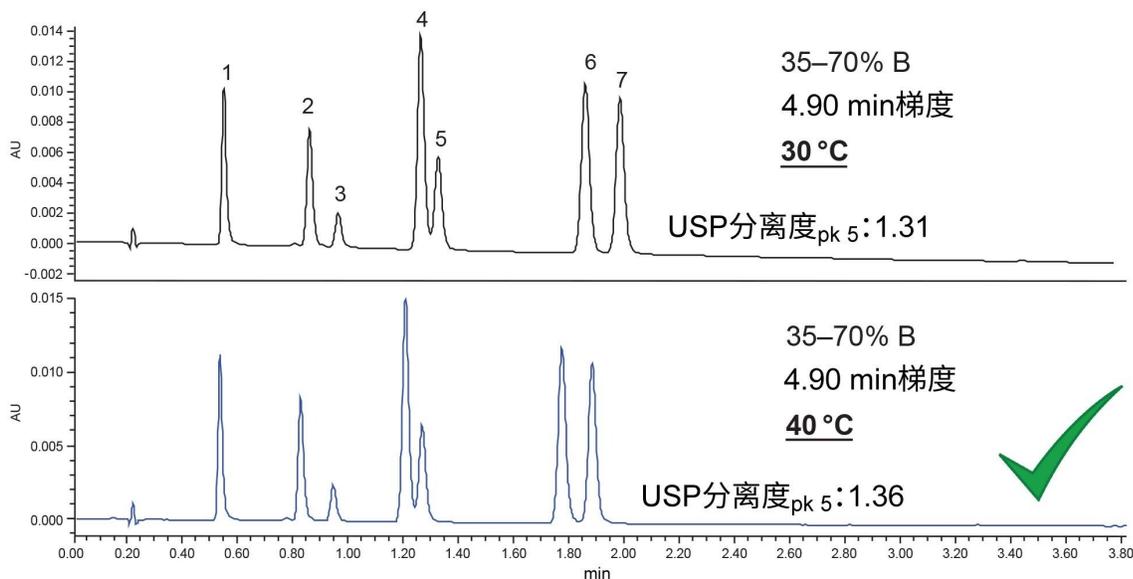


图6.254 nm处的柱温优化组分ID列于图1。

通过提高柱温，分离效率略有提高，USP分离度从30 °C时的1.31增加至40 °C时的1.36。客观地说，这种改进将在未来发挥用处，但柱温在分离这些化合物时似乎并不起到主要作用。最后要尝试的改善分离的方法是增加色谱柱柱长。这样做可以使色谱柱的柱效（通常称为理论塔板数或柱长与粒径比(L/dp)）翻倍，从而达到更出色的整体分离能力。通过将50 mm 2.5 μm颗粒色谱柱(L/dp为20,000)更换为100 mm 2.5 μm颗粒色谱柱(L/dp 40,000)，关键的莠灭津和扑灭津对应能够完全分离。图7显示了使用适当缩放的梯度在长度为100 mm的两种色谱柱上分离该混合物的结果。

## 改用100 mm色谱柱(220 nm)

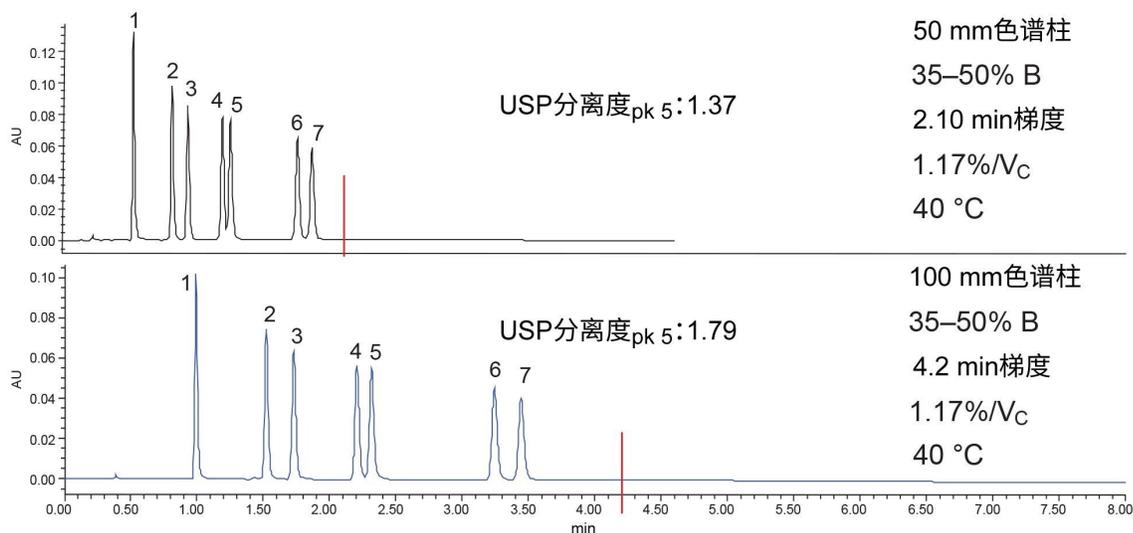


图7.三嗪类除草剂在50 mm和100 mm XBridge Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱（使用2.5 μm颗粒）上的分离结果。最终梯度条件为流动相B在2.1 min (50 mm)或4.2 min (100 mm)内由35%增加至50%。梯度斜率(1.17%/V<sub>C</sub>)和柱温(40 °C)与优化条件相同。检测波长为220 nm。调整梯度以缩短运行时间。红线表示梯度结束。组分ID列于图1。

在进行色谱柱缩放之前，将方法的流动相B梯度范围缩小至35%~50%以缩短进样周期。在缩短方法时间的过程中，保持优化的梯度斜率1.17%/V<sub>C</sub>和柱温40 °C。将梯度终点调整为50%流动相B纯粹是为了节省时间，由于梯度斜率没有变化，因此方法性能不受影响。将这种精简后的方法缩放至100 mm色谱柱后，所有组分均得到完全分离，最低USP分离度值为1.79。至此，该方法开发活动视为已完成，可用于样品分析或方法验证实验。系统性筛选策略将方法创建时间缩短至11小时（两天），其中包括优化时间。将快速的系统性筛选策略与稳定的MaxPeak Premier色谱柱相结合，分析人员可快速获得可靠的结果，始终对结果充满信心。

## 结论

在作物管理中，三嗪类除草剂广泛用于控制入侵植物物种。使用这些化合物可能导致土壤和地下水污染，对水生生态系统产生负面影响。因此，在这些化合物的应用领域中对其进行监测至关重要。实现化合物实现基线分离

，对于有效监测这些分析物非常重要。高端质谱技术也许能够按质量数区分化合物，但实现基线分离可大幅减少潜在的离子抑制或离子增强，让仪器得以提供更优质的结果。

分步方法开发可以简化流程，加快方法开发速度，让新手用户也更容易上手。本应用纪要概述的系统性筛选策略就是其中一个示例。借助于简化的流程，我们在两天内创建了一种可用于七种三嗪类除草剂的方法，包括优化方法所用的时间。在本例中，创建方法仅仅花了11小时仪器运行时间，共两天。通过将其与MaxPeak Premier色谱柱相结合，消除了分离中的许多疑虑。MaxPeak Premier色谱柱可减少分析物与色谱柱金属表面之间可能发生的次级相互作用。在常规方法开发工作流程中使用该色谱柱可确保仅获得理想结果，无需担忧次级相互作用的不良影响。

---

## 参考资料

1. Graymore M, Stagnitti F, Allinson G. Impacts of Atrazine in Aquatic Ecosystems. *Environmental International* 483–495 2001.
2. Pan X, Xu L, He Z, Wan Y. Occurrence, fate, Seasonal Variability, and Risk Assessment of Twelve Triazine Herbicides and Eight Related Derivatives in Source, Treated, and Tap Water of Wuhan, Central China. *Chemosphere*. 2023.
3. Maziarz M, McCarthy S, Wrona M. 使用系统性筛选策略提高方法开发效率，沃特世应用纪要，[720005026ZH](#)，2014。
4. Berthelette KD, Nguyen JM, Turner, J. 在配备UV和QDa检测器的ACQUITY Arc上使用系统性筛选策略对10种抗生素化合物进行方法开发，沃特世应用纪要，[720007352ZH](#)，2021。
5. Berthelette KD, Turner JE, Walter TH, Haynes K. 使用系统性筛选策略和MaxPeak HPS技术开发去铁胺及其强制降解产物的UHPLC分析方法，沃特世应用纪要，[720007834ZH](#)，2022。
6. Hong P, McConville P. 在液相色谱方法开发中实施系统性筛选策略的全面解决方案，沃特世白皮书，[720005268ZH](#) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005268en.pdf>>，2018。
7. Delano M, Walter TH, Lauber M, Gilar M, Jung MC, Nguyen JM, Boissel C, Patel A, Bates-Harrison A, Wyndham K. Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal.Chem.* 93 5773–5781 2021.

8. Walter TH, Alden BA, Belanger J, Berthelette KD, Boissel C, Delano M, Kizekai L, Nguyen JM, Shiner S. Modifying the Metal Surfaces in HPLC Systems and Columns to Prevent Analyte Adsorption and Other Deleterious Effects. *LCGC Supplement*, June 28–34 2022.
9. Layton C, Rainville P. 使用MaxPeak HPS技术分析非甾体抗炎药的优势，沃特世应用纪要，[720007531ZH](#)，2022。
10. Alkhateeb F, Rainville P. MaxPeak Premier色谱柱在磷酸地塞米松及相关化合物分析中的批间稳定性，沃特世应用纪要，[720007350ZH](#)，2021。

---

## 特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

[ACQUITY QDa质谱检测器 <https://www.waters.com/134761404>](https://www.waters.com/134761404)

[Empower色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

720007923ZH，2023年7月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号